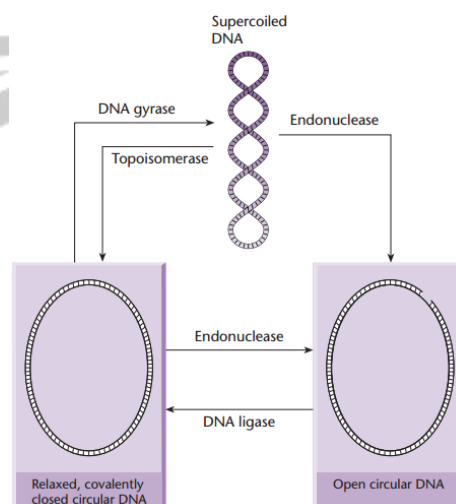


II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Deskripsi, Fungsi, dan Kegunaan Plasmid

Plasmid merupakan DNA ekstrakromosomal yang dapat bereplikasi secara autonom dan berukuran kira-kira 1-500 kb serta merupakan DNA sirkuler yang terdapat dalam bakteri (Acquaah, 2004). Plasmid dapat menjadi vektor gen yang mengkode fungsi spesifik dalam bakteri, seperti resistensi terhadap antibiotik tertentu (Casali dan Preston, 2003). Plasmid hanya mengandung sebagian kecil gen yang tidak diperlukan untuk bertahan hidup dan bereproduksi (Reece dkk., 2011). Plasmid dalam bakteri secara umum berbentuk DNA rantai ganda sirkuler yang secara stabil diwariskan ke keturunannya. Akan tetapi ada pula plasmid yang berbentuk linear yang ditemukan pada beberapa varietas bakteri, seperti *Streptomyces* sp. dan *Borrelia burgdorferi*. Struktur plasmid dapat dilihat pada Gambar 1 (Primrose dkk., 2001).



Gambar 1. Struktur plasmid secara superkoil, tertutup kovalen, dan terbuka (Sumber: Primrose dkk., 2001)

Plasmid sering digunakan sebagai vektor kloning karena memungkinkan untuk melakukan kloning secara rutin dan melakukan manipulasi sebagian kecil DNA yang merupakan dasar teknik molekuler. Syarat plasmid sebagai vektor kloning yang baik adalah memiliki ukuran yang relatif kecil, memiliki *origin of replication* (ori) yang merupakan situs untuk replikasi DNA yang memungkinkan plasmid untuk bereplikasi secara terpisah dari kromosom sel inang, memiliki *multiple cloning site* yang merupakan daerah untuk memasukkan materi genetik, memiliki gen penanda yang memungkinkan untuk seleksi dan identifikasi bakteri yang telah tertransformasi dengan plasmid rekombinan, memiliki sekuen promotor RNA polymerase yang digunakan untuk transkripsi RNA, serta memiliki sekuen primer DNA *sequencing* yang memungkinkan urutan nukleotida fragmen DNA kloning untuk dimasukkan ke dalam plasmid (Thieman dan Palladino, 2004)

Plasmid yang telah disisipi gen target kemudian akan ditransformasi ke dalam sel inang untuk tujuan perbanyakan atau untuk memproduksi protein dalam jumlah besar yang kemudian diekspresikan (Thieman dan Palladino, 2004; Reece dkk., 2011). Plasmid sebagai vektor kloning sering digunakan untuk memperbanyak gen target yang mengekspresikan fenotip tertentu seperti kemampuan resistensi terhadap antibiotik, produksi antibiotik, fermentasi gula, produksi enterotoksin, resisten terhadap logam berat, serta kemampuan untuk menginduksi tumor pada tanaman (Primrose dkk., 2001).

B. Plasmid pTA7002-*AtRKD4*

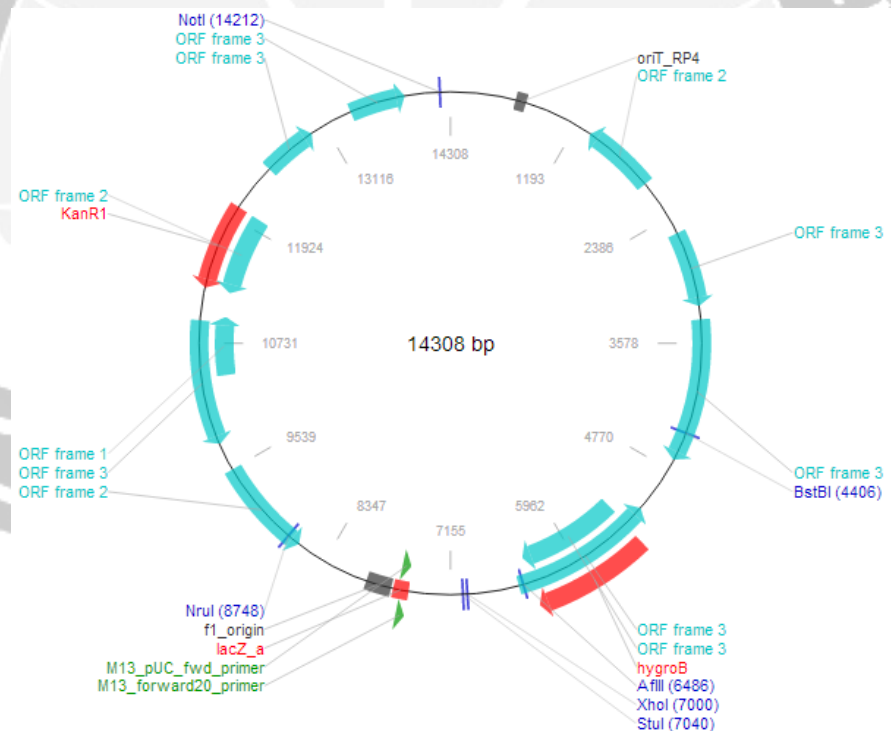
Plasmid pTA7002 merupakan salah satu plasmid yang sering digunakan proses transformasi pada pembuatan tanaman transgenik. Plasmid ini memiliki penanda seleksi *HPT* dan *NPT II* sehingga mudah untuk dideteksi keberhasilan transformasinya ke dalam bakteri pada medium seleksi (Addgene, 2016). Plasmid ini merupakan vektor yang kompatibel untuk induksi transkripsi (Aoyama dan Chua 1997).

Plasmid pTA7002 dengan panjang 14 kb memiliki CaMV35S promotor yang merupakan promotor kuat yang diekspresikan pada berbagai jaringan dan tahap pertumbuhan sebagian besar spesies tanaman. Plasmid ini juga memiliki gen *hygromycin phosphotransferase* (HPT) dan gen *KanR1* yang berfungsi sebagai penanda seleksi, serta memiliki sistem *glucocorticoid-inducible* (Park dkk., 2012; Kang dkk., 1999; dan Addgene, 2016). Sistem *glucocorticoid-inducible* memiliki dua komponen utama yaitu faktor transkripsi yang meregulasi glukokortikoid atau disebut gen *GVG*, serta sistem yang mengandung gen yang disisipkan. Gen yang disisipkan akan terekspresikan apabila diinduksi oleh senyawa glukokortikoid (Aoyama dan Chua, 1997).

Struktur plasmid pTA7002 dapat dilihat pada Gambar 2.

Plasmid pTA7002-*AtRKD4* merupakan plasmid pTA7002 yang disisipi gen *AtRKD4* yang diisolasi dari *Arabidopsis thaliana*. Gen *RKD* (*RWP-RK Domain-containing*) merupakan kelompok faktor transkripsi yang mempunyai motif protein RWP-RK yang ditemukan spesifik pada tanaman dan bertanggung jawab terhadap perkembangan gametofit (Chardin dkk., 2014).

Gen *AtRKD4* merupakan salah satu dari lima gen *RKD* yang terkandung dalam tanaman *A. thaliana* yang diekspresikan pada awal pembentukan embrio (Közegi dkk., 2011). Gen ini akan menginduksi embriosomatik pada tahap awal perkembangan tanaman transgenik yang dapat berpotensi meningkatkan embriogenesis somatik pada tanaman yang disisipi gen tersebut. Ekspresi ektopik konstitutif *RKD4* mengakibatkan proliferasi sel terus menerus tanpa diferensiasi, sehingga dapat meningkatkan keberhasilan embriogenesis somatik pada tanaman (Waki dkk., 2011).



Gambar 2. Struktur Plasmid pTA7002 (Sumber: Addgene, 2016).

Gen *AtRKD4* dan *HPT* pada plasmid pTA7002-*AtRKD4* dapat dideteksi dengan mengamplifikasi kedua gen tersebut menggunakan primer spesifik. Hasil amplifikasi kedua gen ini jika divisualisasi menggunakan gel agarosa

yang menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 380 bp untuk gen *AtRKD4* dan ± 500 bp untuk gen *HPT* (Mursyanti dkk., 2015).

C. *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

Agrobacterium tumefaciens EHA105 merupakan salah satu strain dari bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Bakteri ini merupakan bakteri tanah yang dapat menyebabkan tumor pada tanaman dengan cara mentransfer sebagian DNA dari *Tumor inducing plasmid* (Ti) ke dalam sel tanaman sehingga DNA tersebut akan terintegrasi ke dalam kromosom tanaman. Kemampuan bakteri ini dalam mentransfer DNA merupakan dasar dari rekayasa genetik yang paling umum digunakan pada tanaman (Bins dan Campbell, 2001).

Sel *Agrobacterium tumefaciens* berbentuk batang pendek berukuran 2,5 sampai 3 mikron, bersifat motil dengan jumlah flagela 1 hingga 4, merupakan bakteri Gram negatif, dan tumbuh optimum pada suhu 25-28°C. Koloni *Agrobacterium tumefaciens* pada agar umumnya berbentuk *circular*, berwarna putih dan tembus pandang, dengan bentuk tepi *entire* dan permukaannya tampak berkilau. Pertumbuhan *Agrobacterium tumefaciens* pada medium cair akan mengakibatkan medium tampak sedikit keruh dengan pelikel tipis (Holt dan Bergey, 1994). .

Agrobacterium tumefaciens merupakan bakteri fakultatif anaerob. Pada medium susu, bakteri ini menyebabkan koagulasi secara perlahan dan menyebabkan kondisi medium menjadi netral cenderung basa. Bakteri ini membentuk indol dalam jumlah sedikit, mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit, serta katalase positif. Selain itu, bakteri ini tidak mampu menghidrolisis pati,

dan menghasilkan sedikit asam pada medium glukosa, fruktosa, arabinosa, galaktosa, manitol dan salisin (Holt dan Bergey, 1994).

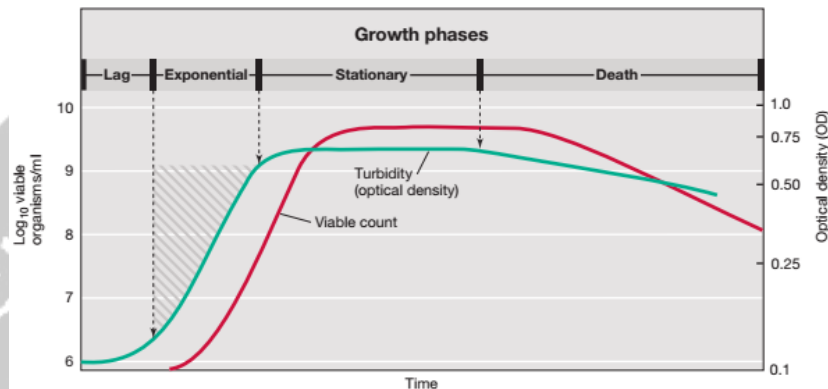
Agrobacterium tumefaciens strain EHA105 dilaporkan sebagai strain yang paling efisien dengan tingkat frekuensi transformasi yang lebih tinggi dari pada strain lainnya seperti strain AGL1 dan MP90 (Pratheesh dkk., 2012; Chetty dkk., 2012). Tingkat efisiensi transformasi *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 sebesar 40%, lebih tinggi dibandingkan dengan strain AGL1 dan MP90. Strain bakteri ini juga dikenal memiliki kombinasi terbaik dari efisiensi transformasi yang tinggi serta lebih efisien dalam mentransfer T-DNA tunggal yang diinsersikan gen target ke dalam genom tanaman (Chetty dkk., 2012).

Agrobacterium tumefaciens EHA105 merupakan strain yang memiliki kemampuan hipervirulensi tinggi, hal ini menyebabkan strain ini sering dimanfaatkan dalam proses transformasi (Trinh dkk., 1998), terutama transformasi pada spesies tanaman agronomis penting seperti tomat, pisang, anggur, jahe, *white spruce*, dan *rape seed*. *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 memiliki plasmid Ti (*Tumour inducing*) *pEHA105* (*pTiBo542DT-DNA*) yang mengandung gen penanda *rif* yang menyebabkan resistensi terhadap antibiotik rifampisin (Chetty dkk., 2012).

D. Pola Pertumbuhan Bakteri pada *Batch Culture*

Batch culture merupakan sistem kultur tertutup, yaitu tidak ada penambahan medium dan nutrisi baru selama inkubasi sehingga bakteri hanya dapat menggunakan nutrisi pada medium yang diberikan saat awal kultur.

Bakteri yang ditumbuhkan pada sistem kultur ini biasanya akan mengalami empat fase (Gambar 13) yaitu fase adaptasi, logaritmik, stasioner dan kematian (Hogg, 2005).



Gambar 3. Pola pertumbuhan bakteri dalam *batch culture* (Sumber: Madigan dkk., 2012)

Fase adaptasi terjadi pada awal bakteri diinokulasikan pada medium pertumbuhannya yang dikarenakan bakteri membutuhkan waktu untuk sintesis enzim yang berfungsi untuk mencerna nutrisi dalam medium dan mengatur metabolisme dalam sel. Setelah melewati fase adaptasi, bakteri akan bertambah secara teratur menjadi dua kali lipat pada interval waktu tertentu selama inkubasi, satu sel akan membelah menjadi dua sel dan terus-menerus membelah selama kondisi optimal yang dikenal sebagai fase logaritmik. Fase logaritmik bakteri akan dibatasi oleh faktor lingkungan sehingga laju pertumbuhannya akan mengalami penurunan yaitu jumlah sel yang berkembang biak sama dengan jumlah sel yang mati yang dikenal sebagai fase stasioner. Selanjutnya laju pertumbuhan populasi bakteri semakin menurun karena disebabkan laju kematian yang melampaui laju pembiakkan, kondisi ini mencirikan bahwa bakteri telah memasuki fase kematian (Hogg, 2005).

E. Transformasi pada Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* dengan Metode

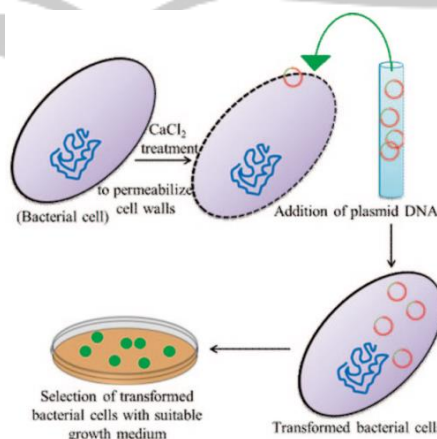
Freeze Thaw

Transformasi merupakan proses pemasukan DNA bebas ke dalam sel bakteri. DNA target yang berhasil disisipkan ke dalam vektor, selanjutnya dilakukan pemasukan vektor rekombinan ke dalam sel inang untuk tujuan memperbanyak dan mempelajari kerja ekspresi dari gen yang terkandung di dalam DNA rekombinan. Transformasi dapat dilakukan dengan metode elektroporasi, metode konjugasi, metode *heat shock* dan metode *freeze thaw*. Metode elektroporasi merupakan metode transformasi dengan menggunakan aliran listrik yang kuat untuk membuat dinding sel inang menjadi permeabel terhadap DNA bebas sehingga dapat masuk ke dalam sel inang. Metode konjugasi merupakan suatu proses alami pada beberapa bakteri dengan terjadinya transfer genetik antarsel prokariotik. Metode *heat shock* diawali dengan pembuatan sel kompeten dengan perlakuan CaCl_2 , kemudian diberi kejutan panas dengan suhu 42°C selama 90 detik (Acquaah, 2004). Metode *heat shock* sering digunakan untuk transformasi pada bakteri *Escherichia coli* (Inoue dkk, 1990; Janjua dkk., 2014; Yoo, 2010).

Metode *freeze thaw* merupakan metode transformasi yang dilakukan dengan melakukan inkubasi bakteri target dan vektor plasmid yang akan ditransformasikan secara bersama-sama dalam nitrogen cair. Transformasi pada *Agrobacterium tumefaciens* menggunakan metode ini diawali pembuatan sel kompeten dengan menumbuhkan bakteri pada medium YEP atau LB yang telah ditambahkan senyawa selektif seperti antibiotik rifampisin, kemudian sel

bakteri disuspensikan dalam larutan CaCl_2 , sel kompeten diinkubasi secara bersamaan dengan DNA plasmid yang akan ditransformasikan dalam nitrogen cair selama 5 menit (Widyasari dan Suhandono, 2007).

DNA secara normal tidak dapat dimasukkan ke bakteri, akan tetapi sel kompeten dari bakteri dapat menerima DNA dari luar atau plasmid. Pembuatan sel kompeten dapat dilakukan secara buatan menggunakan bahan kimia sehingga sel bakteri permeabel terhadap DNA. Pembuatan sel kompeten menggunakan bahan kimia dapat dilakukan dengan mensuspensikan sel-sel dalam larutan yang mengandung konsentrasi tinggi kalsium (CaCl_2), sehingga terbentuk lubang-lubang kecil dalam sel bakteri. DNA ekstrakromosomal atau plasmid akan dipaksa untuk masuk ke dalam sel dengan melakukan inkubasi sel kompeten dan DNA bersama-sama dalam es atau nitrogen cair diikuti dengan *heat shock* atau pun proses *thawing* singkat pada suhu 37°C yang menyebabkan bakteri mengambil DNA masuk ke dalam sel (Gambar 4) (Das dan Dash, 2015; Widyasari dan Suhandono, 2007).



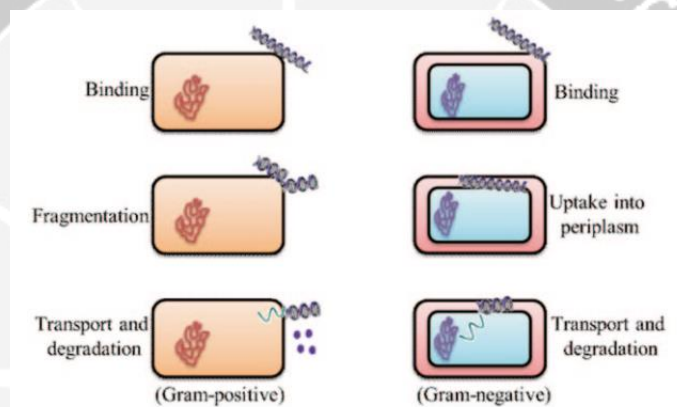
Gambar 4. Pembuatan sel kompeten dengan menggunakan larutan CaCl_2 dan proses transformasi (Sumber: Das dan Dash, 2015)

Mekanisme transformasi menggunakan metode *freeze thaw* diperkirakan melalui difusi pasif molekul DNA yang menembus ke dalam sel bakteri beku-dicairkan (*freeze-thaw*) melalui luka sementara di dinding dan membran sel (Holsters dkk., 1978). Terjadinya penyerapan DNA yang bergantung pada rusaknya dinding sel bakteri oleh paparan kation divalen dan perubahan suhu yang cepat yang mengubah fluiditas membran sehingga vektor rekombinan atau DNA target dapat masuk ke dalam sel bakteri inang. Perkiraan efisiensi transformasi dengan menggunakan metode ini sekitar 10^2 hingga 10^3 transforman/ μg DNA. Kelebihan dari metode ini adalah tidak memerlukan peralatan spesial dan mahal (Wang, 2006).

Molekul DNA akan terikat dengan molekul reseptor lipopolisakarida (LPS) pada permukaan sel kompeten. Kation divalen menghasilkan kompleks koordinasi dengan molekul DNA bermuatan negatif dan LPS. Penurunan potensial membran menurunkan potensial sel yang akhirnya memungkinkan pergerakan DNA bermuatan negatif ke dalam sel bakteri (Das dan Dash, 2015). Jalur transformasi pada bakteri Gram negatif (seperti *Agrobacterium tumefaciens*) dan Gram positif dapat dilihat pada Gambar 5.

Beberapa faktor yang menyebabkan rendahnya efisiensi transformasi menggunakan metode *freeze thaw* adalah ketidakmurnian DNA yang ditransformasikan, jumlah DNA yang ditransformasikan terlalu banyak ($>10\mu\text{g}$), penanganan sel yang kurang tepat, perhitungan yang salah pada faktor pengenceran sel dan konsentrasi DNA yang digunakan, tingkat pertumbuhan kultur yang buruk atau kurang tepat (Das dan Dash, 2015).

Nilai OD₆₀₀ kultur bakteri berkaitan dengan massa sel atau jumlah sel. Apabila nilai OD₆₀₀ kultur tidak tepat, maka sel bakteri yang siap untuk ditransformasikan jumlahnya sangat sedikit, sehingga efisiensi transformasi akan rendah. Kondisi kultur pada fase logaritmik awal akan menyebabkan transformasi berjalan lebih efisien, oleh karena itu perlu diketahui nilai OD₆₀₀ kultur yang tepat berada pada fase logaritmik awal bakteri tersebut (Jyothishwaran dkk., 2007; Dutt dan Grosser, 2009).



Gambar 5. Jalur transformasi pada bakteri Gram positif dan negatif (Sumber: Das dan Dash, 2015)

Penelitian Corredoira dkk., (2005) menghasilkan data bahwa OD₆₀₀ 0,6 atau lebih tinggi menunjukkan kurva pertumbuhan bakteri berada pada fase logaritmik tengah, sementara nilai OD₆₀₀ 0,3 dan 0,9 masing-masing berkorelasi dengan awal dan akhir fase logaritmik. Beberapa proses transformasi pada *Agrobacterium tumefaciens* dilakukan dengan menggunakan nilai OD₆₀₀ kultur 0.4-0.5 yang berada pada fase logaritmik tengah sehingga efisiensi transformasi yang diperoleh masih rendah (Jyothishwaran dkk., 2007; Hofgen dan Willmitzer, 1988). Optimasi nilai OD₆₀₀ kultur yang dilakukan Jyothishwaran dkk., (2007) menunjukkan bahwa fase logaritmik awal *Agrobacterium*

tumefaciens strain LBA4404 (pAL 4404) berada pada nilai OD₆₀₀ kultur 0.3, dan menghasilkan efisiensi transformasi yang cukup tinggi yaitu 3.6×10^5 T/ μ g DNA, serta efisiensi transformasi akan semakin menurun pada nilai OD₆₀₀ kultur yang semakin meningkat.

Penelitian Pratheesh dkk., (2012) berhasil melakukan transformasi plasmid pCAMBIA 1304 ke dalam tiga strain *Agrobacterium tumefaciens* yaitu EHA 101, LBA 4404, EHA 105 menggunakan metode *freeze thaw* dengan waktu inkubasi dalam nitrogen cair 5 menit. Penelitian Movahedi dkk., (2014) juga berhasil melakukan transformasi plasmid pBI121-CARNAC6 ke *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 dengan menggunakan metode dan waktu inkubasi yang sama dengan penelitian Pratheesh dkk., (2012). Keberhasilan proses transformasi pada bakteri *Agrobacterium tumefaciens* dengan metode dan waktu inkubasi yang sama dengan penelitian Pratheesh dkk., (2012) juga dialami dalam penelitian Widyasari dan Suhandono (2007) dan penelitian Jyothishwaran dkk., (2007).

Transformasi pada *Agrobacterium tumefaciens* memiliki beberapa kelebihan seperti mudah dilakukan dan efisiensinya cukup tinggi dibandingkan dengan bakteri lainnya (Sharma dkk., 2005; Assaduzzaman dkk., 2008). Transformasi dengan bakteri ini juga memiliki efisiensi transformasi dengan salinan gen tunggal yang dihasilkan lebih tinggi. Gen dengan salinan tunggal lebih mudah dianalisis dan biasanya bersegregasi mengikuti pola pewarisan Mendel sehingga ketika digunakan untuk pembuatan tanaman transgenik, tanaman yang dihasilkan memiliki ekspresi yang lebih stabil. Akan tetapi,

keberhasilan transformasi *Agrobacterium tumefaciens* masih terbatas (Iganacimuthu dkk., 2000; Rahmawati, 2006).

F. Efisiensi Transformasi

Efisiensi transformasi merupakan salah satu parameter untuk mengetahui keberhasilan transformasi gen. Efisiensi transformasi dapat dihitung sebagai jumlah koloni transforman terbentuk (CFU) yang dihasilkan oleh 1 µg DNA dan diukur dengan melakukan serangkaian kontrol reaksi transformasi menggunakan DNA yang diketahui jumlahnya secara jelas. Koloni transforman yang terbentuk dapat dihitung pada medium selektif pada akhir pengamatan (Das dan Dash, 2015). Untuk melakukan konfirmasi hasil transformasi dapat dilakukan dengan metode PCR koloni dan dilanjutkan dengan elektroforesis (Casali dan Preston, 2003).

G. Polymerase Chain Reaction (PCR) dan PCR Koloni

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode perbanyakan suatu sekuen DNA dengan menggunakan reaksi enzimatik, yaitu menggunakan DNA polimerase (Primrose dkk., 2001). Metode PCR berdasar pada amplifikasi fragmen DNA dengan menggunakan enzim DNA polimerase dan primer oligonukleotida yang menghibridisasi ke untai lainnya dari sekuen DNA spesifik yang akan diamplifikasi (Klug dan Cummings, 1994). Komponen-komponen PCR antara lain enzim DNA polimerase, DNA template, *monovalent cation*, *divalents cations*, *deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs), primer dan pH bufer (Sambrook dan Russel, 2001).

Reaksi PCR terdiri dari 3 tahap yaitu denaturasi, penempelan primer, dan pemanjangan. Denaturasi merupakan suatu proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal. Tahap denaturasi umumnya dilakukan selama 1-2 menit dengan suhu berkisar antara 94-95 °C. Penempelan primer merupakan tahapan penempelan primer pada DNA cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. Primer oligonukleotida biasanya memiliki panjang 17-30 basa. Primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Tahap penempelan primer umumnya dilakukan selama 1-2 menit dengan suhu berkisar antara 50-65 °C. Pemanjangan merupakan proses polimerisasi rantai DNA baru berdasarkan informasi yang ada pada DNA cetakan. Rantai DNA yang baru akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA cetakan. Rantai DNA yang baru selanjutnya berfungsi sebagai DNA cetakan bagi reaksi polimerisasi berikutnya. Umumnya reaksi PCR dilakukan sebanyak 25-30 siklus (Primrose dkk., 2001; Sambrook dan Russel, 2001; Yuwono, 2006).

PCR koloni merupakan metode untuk mendeteksi secara cepat koloni hasil transformasi genetik (koloni transforman). Metode PCR koloni membutuhkan kultur bakteri yang telah ditumbuhkan selama 12-24 jam dengan tujuan untuk mendapatkan sumber DNA yang cukup untuk analisis PCR. PCR koloni dapat mendeteksi koloni transforman dengan cara menggunakan primer spesifik untuk DNA yang disisipkan, sehingga dapat mendeteksi adanya DNA sisipan dalam koloni transforman menggunakan PCR. Penggunaan primer yang tepat akan memberikan produk PCR yang baik (Casali dan Preston, 2003).

Koloni transforman yang diperlukan dalam melakukan deteksi menggunakan PCR koloni minimal berukuran 1 mm. Jumlah bakteri yang dibutuhkan dalam deteksi menggunakan PCR koloni sangat kecil. Apabila jumlah bakteri dalam PCR *mix* terlalu banyak maka akan menyebabkan penghambatan dalam reaksi PCR. Tahap denaturasi awal dengan suhu 95°C selama 2 menit pada PCR koloni untuk melisiskan dinding sel bakteri sebelum siklus PCR dimulai dan tahap denaturasi berfungsi untuk memisahkan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Produk PCR akan dianalisis lebih lanjut menggunakan elektroforesis pada gel agarosa (Casali dan Preston, 2003).

H. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, serta memurnikan dan melihat ukuran fragmen DNA (Sambrook dan Russel, 2001). Analisis produk PCR menggunakan elektroforesis dapat digunakan untuk mengidentifikasi keberhasilan proses transformasi dengan cara membandingkan ukuran DNA plasmid dari transforman dengan *parent vector*, DNA plasmid yang tampaknya lebih besar kemungkinan mengandung DNA sisipan (Casali dan Preston, 2003). Prinsip kerja elektroforesis adalah pergerakan molekul-molekul yang bermuatan negatif (anion) menuju kutub positif (anoda), sedangkan molekul-molekul yang bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (katoda) (Klug dan Cummings, 1994).

Elektroforesis gel sering digunakan untuk pemisahan DNA, RNA dan protein. Terdapat 2 jenis elektroforesis gel yaitu elektroforesis gel

poliakrilamida dan agarosa. Gel poliakrilamida biasanya digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran kecil (5-500 bp), sedangkan gel agarosa digunakan untuk fragmen DNA yang lebih besar (50-20.000 bp) (Sambrook dan Russel, 2001).

Faktor-faktor yang memengaruhi kecepatan molekul DNA dalam elektroforesis gel agarosa antara lain ukuran DNA, struktur dan konformasi molekul DNA, densitas muatan, konsentrasi gel, voltase pada metrik gel, dan komposisi bufer. Elektroforesis membutuhkan larutan bufer untuk menjaga pH dalam kondisi stabil. Larutan bufer yang umum digunakan adalah TAE (*Tris-Acetate EDTA*), TBE (*Tris-Borate EDTA*), dan TPE (*Tris-Phosphate EDTA*). TAE memiliki kapasitas bufer paling lemah diantara ketiga bufer tersebut, sedangkan TBE dan TPE memiliki kapasitas bufer yang lebih tinggi tetapi harganya relatif lebih mahal. Molekul DNA yang berbentuk *supercoiled* lebih cepat bermigrasi dibandingkan bentuk linear, molekul DNA dengan densitas yang lebih tinggi akan bermigrasi lebih cepat, gel yang berkonsentrasi tinggi dapat melewati molekul DNA yang berukuran kecil, begitu pula sebaliknya. Elektroforesis membutuhkan arus sebagai medium dalam migrasi molekul DNA, voltase yang lebih tinggi akan mempercepat pergerakan molekul daripada voltase yang lebih rendah (Sambrook dan Russel, 2001).

Ukuran dan jarak fragmen DNA yang akan dipisahkan menentukan besarnya konsentrasi gel. Semakin panjang fragmen DNA yang akan dipisahkan, semakin rendah konsentrasi gel yang digunakan dalam elektroforesis. Konsentrasi gel agarosa menentukan kerapatan pori-pori gel,

sehingga akan mempengaruhi pemisahan DNA. Pemisahan DNA tergantung pada ukuran DNA. Molekul DNA yang berukuran lebih kecil memiliki migrasi yang lebih cepat, begitu pula sebaliknya. Menurut Sambrook dan Russel (2001), ukuran dan jarak fragmen DNA yang dipisahkan menentukan besarnya konsentrasi agarosa yang digunakan (Tabel 1).

Tabel 1. Konsentrasi agarosa untuk pemisahan fragmen DNA dengan berbagai ukuran.

Agarosa (%)	Ukuran fragmen DNA
0,5	700 bp hingga 25 kb
0,8	500 bp hingga 15 kb
1,0	250 bp hingga 12 kb
1,2	150 bp hingga 60 kb
1,5	80 bp hingga 4 kb

Sumber: Sambrook dan Russel (2001).

I. Hipotesis

1. Densitas kultur *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 pada OD₆₀₀ yang paling responsif terhadap proses transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* adalah 0,3.
2. Waktu inkubasi pada nitrogen cair yang optimum untuk proses transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 dengan metode *freeze thaw* adalah 5 menit.